БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СВИНЕЙ

УДК 619:578.824.11:616-073
Л.К. Груздев, В.И. Уласов, К.Н. Груздев
(ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ»), г. Москва)

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ СРЕД ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ШТАММА CVS ФИКСИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Введение

Требования валидации выдвигают на первый план необходимость выявления и научного обоснования технологических параметров, которые могут быть критериями качества производимых технологических операций. В нашей стране до сего времени существует исторически сложившаяся невалидированная схема многих технологических этапов производства биопрепаратов, в том числе при подготовке производственных и контрольных штаммов микроорганизмов. Она имеет много недостатков и не соответствует современным требованиям, предъявляемым к качественной и стандартной продукции [4, 5]. Для выполнения требований GMP по каждому культивируемому микроорганизму, которые используются в вакцинном производстве, должны проводиться лабораторные исследования, верификация и документирование исходных штаммов, исходных культур, чтобы гарантировать необходимый уровень качества при их использовании в серийном производстве [1, 2].

Внедрение требований GMP на отечественных биопредприятиях, выпускающих вакцины против бешенства животных, особенно актуально [3]. Процессы внедрения осложняются тем, что не решены некоторые вопросы, связанные с научным обоснованием использования уже имеющихся материалов. Наличие соответствующей документации является ключевым фактором, обеспечивающим работу предприятия в соответствии с требованиями GMP. Для разработки таких документов необходимо проведение большого объема научных исследований, в частности учет и постоянный мониторинг биологических особенностей используемых штаммов вируса бешенства (ВБ).

Целью нашей работы являлось изучение стабилизирующих сред в сравнительном аспекте при сублимационном высушивании фиксированных штаммов ВБ и оценка их эффективности на сохранность активности ВБ в процессе хранения при различных температурных режимах.

Материалы и методы

Изучали следующие штаммы фиксированного ВБ:

- РБ-71 – лиофилизированный с использованием среды, содержащей желатин,

пептон и сахарозу; адаптирован к культуре клеток почки кролика и фибробластам куриных эмбрионов;

- CVS – лиофилизированный с использованием 20% вируссодержащей суспензии мозговой ткани мышей на дистиллированной воде с добавлением 2% сыворотки крови лошади или обезжиренного молока (ОМ);

- «Овечий» («О») – лиофилизированный с использованием 10% вируссодержащей суспензии мозговой ткани овцы на дистиллированной воде с добавлением ОМ.

Штаммы получены из архива коллекции вирусов ВГНКИ с указанием исходного титра.

В качестве стабилизирующих сред брали стерильное обезжиренное молоко, желатину, пептон, сорбит, среду №3 ВГНКИ, в которые добавляли антибиотики (пенициллин, стрептомицин).

Освежение ВБ проводили на мышах линии BALB/c массой 6–12 г.

Референтная положительная сыворотка против ВБ получена из референтной лаборатории Университета г. Любляна (Словения).

При выполнении работы использовали химические реактивы фирм «Sigma», «Serva», «Merck», «OXOID», реактивы российского производства марки ч.д.а. и х.ч., а также стерильный забуференный физиологический раствор (ЗФР) рН 7,0-7,2.

Для определения инфекционной активности вируссодержащего материала готовили десятикратные разведения на ЗФР. На каждое разведение брали по 5 мышей массой 7-8 г. Животных заражали интрацеребрально в объеме 0,03 см^3. За титр вируса принимали наибольшее разведение суспензии, при котором гибель животных достигала 50%.

Наблюдение за мышами вели в течение 21 дня. Специфической считали гибель животных при наличии характерных для экспериментального бешенства клинических признаков болезни (параличи, парезы, коматозное состояние и др.), развивающихся не ранее 5 дней после введения вируссодержащего материала. Подсчет титра вируса проводили по методу Рида и Менча и выражали в lg ЛД$_{50}$/см^3.

Для подтверждения специфичности гибели мышей от ВБ использовали прямой метод флуоресцирующих антител (МФА).

При отборе проб, заражении животных руководствовались рекомендациями, инструкциями по работе со штаммами фиксированного ВБ, утвержденными в установленном порядке.

Микробиологическую стерильность определяли в соответствии с ГОСТ 28085, с использованием тиогликолевой и других бактериальных питательных сред (МПА, МПБ, МППБ, среда Сабуро). Для исключения контаминации микоплазмами проводили посевы на среду Эдварда (жидкую и твердую), внося по 0,25 см^3 в 2 пробирки с каждой средой. Посевы выдерживали в термостате при 37+0,5° С в течение 7 суток, проводя 3 последовательных пассажа. Вирусную контаминацию определяли исследованиями с использованием электронного микроскопа и в реакции гемагглютинации (РГА) с эритроцитами кур. Остаточную влажность, растворимость сухих образцов серий штаммов определяли по общепринятым методикам. Качество высушенных образцов оценивали по стандартности макроструктуры поверхностей и на изломе.

В работе было использовано лабораторное, промышленное холодильное и сублимационное оборудование.

Результаты исследований оценивали с использованием методов статистической обработки, общепринятых в биологии [6, 7]. Вычисление средней арифметической величины (М), средней квадратической ошибки (m) производили с использованием компьютерной программы EXEL. В качестве доверительного интервала был выбран уровень вероятности Р=0,95 (уровень значимости р-0,05).

Результаты и обсуждение

В начале работы была изучена инфекционная активность архивных образцов фиксированного ВБ в зависимости от сроков хранения. Для исследования были взяты лиофилизированные штаммы CVS, «О» и РБ-71, заложенные на хранение в период 1987-1995 гг.

Результаты титрования представлены в табл. 1.

Определение инфекционной активности архивных серий «О», CVS и РБ-71, хранящихся при различных температурных режимах с 1987 г., показало существенную разницу в титре вируса, по сравнению с исходным. Во всех случаях наблюдали снижение активности вируса. Объяснением достоверной разницы инфекционной активности различных серий могли послужить как длительность хранения образцов, так и состав защитной среды, используемой при сублимационном высушивании. Снижение титра культурального ВБ (штамм РБ-71) в процессе хранения было более выражен-

Таблица 1

Результаты титрования исходных штаммов фиксированного ВБ на мышах

Наименование штамма	Дата закладки, год	t °C хранения	Срок хранения, лет	Стабилиз. среда	Титр вируса (M+m), lg $ЛД_{50}/см^3$	
					Исходный	Конечный
«О»	19.03.87	- 10	10	ОМ	5,5	1,6+0,3
		- 20	10		5,5	3,1+0,2
	02.04.87	- 10	10		5,5	1,4+0,2
		- 20	10		5,5	2,8+0,2
	14.04.92	- 10	5		5,3	1,8+0,1
		- 20	5		5,3	3,3+0,2
	07.06.94	- 10	3		5,3	2,3+0,2
		- 20	3		5,3	3,5+0,2
CVS	26.03.92	- 10	5	ОМ	5,8	2,0+0,1
		- 40	5		5,8	3,4+0,3
	27.04.94	- 10	3		5,8	2,4+0,1
		- 40	3		5,8	3,8+0,2
РБ-71	1987	- 10	10	ЖПС	4,0	0,8+0,3
		- 40	10		4,0	1,6+0,2
	1992	- 10	5		4,0	1,8+0,2
		- 40	5		4,0	2,1+0,3

ным, по сравнению с мозговыми штаммами CVS и «О».

При визуальном осмотре образцы штаммов «О» и CVS некоторых серий, высушенные на ОМ, имели плохую растворимость, а высушенные с использованием сыворотки крови лошади – рыхлую осыпавшуюся таблетку (штаммы лиофилизированные с использованием сыворотки крови лошади не титровали).

Перед нами стояла задача изучить возможность замены ОМ и сыворотки крови лошади на другую стабилизирующую среду, отработать режим высушивания, установить сроки сохранения активности лиофилизированного ВБ при различных температурных режимах, в том числе и методом «ускоренного старения». В качестве модели был выбран штамм CVS.

Для получения вирусного материала лиофилизированный штамм CVS фиксированного ВБ предварительно освежали путем однократного интрацеребрального пассажа на мышах линии BALB/c. Полученный материал использовали для заражения 300 белых мышей. Спустя 7 дней после интрацеребрального заражения мышей с клиническими признаками поражения ЦНС умерщвляли. Головной мозг извлекали с соблюдением правил асептики и антисептики, гомогенезировали, готовили 10% вируссодержащую суспензию на ЗФР, которую центрифугировали при 2 тыс. об/мин в течение 30 минут. Надосадочную жидкость отбирали и смешивали с соответствующей стабилизирующей средой в соотношении 1:1, добавляли антибиотики, расфасовывали в ампулы по 1 $см^3$ и подвергали одновременной лиофилизации в одном сушильном аппарате. Замораживание проводили при -50° С в течение 3 часов. Затем материал перегружали в сублимационную установку. Лиофилизация проводилась в следующем режиме: сушка в условиях подъема температуры от -50° С до 0° С в течение 22 часов; сушка в условиях подъема температуры от 0° С до 25° С в течение 5 часов; и последние 3 часа сублимация проходила при 25° С. Общая продолжительность сушки составила 30 часов. Вакуум был в пределах 50-200 мл.рт.ст.

После сублимационного высушивания и запаивания в ампулах сохранялся вакуум.

В условиях лаборатории были приготовлены 12 экспериментальных серий штамма CVS, отличающихся составом стабилизирующей среды [ОМ, желатин-пептон-сахарозная (ЖПС), сорбит-желатинозная (СЖ) и среда №3 ВГНКИ]. Титр инфекционности ВБ определяли до сушки, сразу после сушки, а затем через 6, 12, 18, 24, 36 и 48 месяцев хранения при 4° С, -10–12° С, -40° С, -70° С. Кроме того, использовали экспресс-метод «ускоренного старения» – хранение при 60° С в течение 7 суток.

Все серии штамма CVS ВБ, изготовленные с использованием различных защитных сред, оказались стерильными в бактериальном и микозном отношении, не контаминированными чужеродными вирусами. Обработанные результаты исследований представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, все серии штамма CVS ВБ, изготовленные с использова-

Таблица 2

Результаты проверки активности штамма CVS до и после сублимационной сушки

№ п/п	Стабилизирующая среда	Стерильность до и после сушки	Титр вируса (M+m), lg $ЛД_{50}/см^3$		Остат. влажность, %	Растворимость, мин
			До сушки	После сушки		
1	ОМ	Стерильно	6,6+0,2	5,4+0,1	2,7+0,2	1,0
2	ЖПС	Стерильно	6,6+0,2	5,8+0,3	1,8+0,2	1,0
3	СЖ	Стерильно	6,6+0,2	5,6+0,5	1,8+0,5	1,0-5,0
4	Среда №3 ВГНКИ	Стерильно	6,6+0,2	6,1+0,1	1,6+0,1	1,0

Таблица 3

Сравнительная оценка защитных свойств стабилизирующих сред для штамма CVS в тесте «ускоренного старения»

№ п/п	Стабилизирующая среда	Титр вируса (M+m), lg $ЛД_{50}/см^3$		
		Исходный	После 3 суток	После 7 суток
1	ОМ	5,4+0,1	3,4+0,1	1,8+0,1
2	ЖПС	5,8+0,3	4,4+0,1	3,4+0,1
3	СЖ	5,6+0,5	-	-
4	Среда №3 ВГНКИ	6,1+0,1	5,3+0,1	4,4+0,1

нием различных стабилизирующих сред, теряли инфекционную активность вируса в процессе сушки. Титр активности вируса наиболее заметно снижался при использовании среды ОС. Стабилизирующая СЖ среда оказалась наименее пригодной для использования в качестве защитной при сублимационном высушивании. Она при нагревании карамелизовалась, из-за чего остаточная влажность в препарате плохо поддавалась учету и время на растворение таблетки возрастало.

Остаточная влажность различных серий, приготовленных с использованием сред ОМ, ЖПС и среды №3 ВГНКИ, была в пределах 1,3-2,9%. Содержимое ампул исследованных образцов растворялось в дистиллированной воде в течение 1 минуты, кроме серий, содержащих в качестве стабилизирующей среды СЖ.

Оценку стабильности штамма CVS методом «ускоренного старения», высушенного с различными стабилизаторами, определяли по величине снижения титра инфекционности ВБ для белых мышей через 3, 7 суток хранения при температуре 60° С (табл. 3).

Эти эксперименты подтвердили результаты предыдущего опыта и позволили сделать вывод, что среды №3 ВГНКИ и ЖПС обладают наиболее выраженными защитными свойствами для штамма CVS. Серии штамма CVS со средой высушивания СЖ не были проверены на активность, так как после 7 дней хранения при температуре 60° С препарат карамелизовался и плохо растворялся. Серии лиофилизированного штамма CVS со средой СЖ в дальнейших испытаниях не использовались.

Образцы штамма CVS, лиофилизированного со средой ОМ, быстро теряли свою активность в процессе хранения. После трех суток хранения потеря активности составила 38,1%, а через 7 суток – 66,3, в то время как при использовании среды №3 ВГНКИ эти показатели составили 13,2% и 27,9%.

Опытные серии штамма CVS испытывали на сохранение инфекционной активности при различных температурных режимах в различные временные периоды. Результаты проверки приведены в табл. 4.

Как видно из табл. 4, температура 4° С оказалась наименее подходящей для хранения лиофилизированного штамма CVS, независимо от среды высушивания. Уже через 6 месяцев после начала эксперимента наблюдалось снижение активности вируса в образцах: со средой высушивания ОМ – на 24,1%, с ЖПС – на 20,7% и со средой №3 ВГНКИ – на 19,7%. В дальнейшем, к 12 и 24 месяцам, снижение активности штам-

Таблица 4

Изменение активности лиофилизированного штамма CVS ВБ в процессе хранения

Стабилизирующая среда	Титр вируса (M+m), lg $ЛД_{50}/см^3$					
	Исходный	6 мес	12 мес	24 мес	36 мес	48 мес
При 4° С						
ОМ	5,4+0,1	4,1+0,3	2,7+0,1	2,1+0,2	-	-
ЖПС	5,8+0,3	4,6+0,3	3,9+0,1	3,1+0,1	-	-
Среда №3 ВГНКИ	6,1+0,1	4,9+0,1	4,3+0,1	3,4+0,1	-	-
При -10–12° С						
ОМ	5,4+0,1	4,4+0,1	3,4+0,1	2,4+0,1	2,1+0,3	1,6+0,2
ЖПС	5,8+0,3	5,4+0,1	4,7+0,1	3,4+0,1	2,8+0,1	2,4+0,1
Среда №3 ВГНКИ	6,1+0,1	5,9+0,1	5,2+0,1	4,4+0,1	3,6+0,2	3,1+0,1
При -40° С						
ОМ	5,4+0,1	5,4+0,2	5,4+0,2	5,2+0,3	4,8+0,1	4,4+0,1
ЖПС	5,8+0,3	5,8+0,1	5,8+0,2	5,6+0,1	5,4+0,1	5,1+0,1
Среда №3 ВГНКИ	6,1+0,1	6,1+0,1	6,1+0,1	6,1+0,1	5,8+0,1	5,6+0,1
При -70° С						
ОМ	5,4+0,1	5,4+0,1	5,2+0,2	5,2+0,1	5,2+0,2	5,1+0,1
ЖПС	5,8+0,3	5,8+0,3	5,6+0,3	5,8+0,3	5,8+0,3	5,8+0,3
Среда №3 ВГНКИ	6,1+0,1	6,1+0,1	6,0+0,1	6,1+0,1	6,1+0,1	6,1+0,1

ма CVS продолжалось. В сроки 36 и 48 месяцев исследования образцов, хранящихся при температуре 4° С, не проводили в связи с выявленной тенденцией резкого снижения титра вируса.

Температура хранения -10–12° С способствовала более длительной сохранности штамма CVS. Лучшие показатели активности вируса были обнаружены в образцах, высушенных с использованием среды №3 ВГНКИ.

Снижение активности к 12 и 24 месяцам хранения составило 14,8% и 27,9%. В образцах, хранившихся 36 и 48 месяцев, активность вируса составляла, соответственно, 56,0% и 50,8%.

Титр штамма CVS практически не изменялся в течение 48 мес при температуре хранения -40° С и -70° С, независимо от состава стабилизирующей среды. Лишь в образцах с защитной средой ОС спустя 36 мес хранения при -40° С наблюдалось некоторое снижение титра активности вируса.

Выводы

Проведенные исследования по подбору стабилизирующих сред для сублимационного высушивания мозгового штамма CVS ВБ при комплексной оценке показали, что наиболее подходящей является среда №3 ВГНКИ. Она проста в приготовлении, обеспечивает высокие защитные свойства как при сублимационном высушивании, так и в процессе длительного хранения.

Сорбит-желатинозная среда имеет существенный недостаток. Она карамелизуется, не позволяет достоверно определять остаточную влажность в препарате, а также отрицательно влияет на растворимость препарата.

Результаты исследований дали возможность рекомендовать для приготовления лиофилизированных препаратов штамма CVS ВБ в качестве стабилизирующей среду №3 ВГНКИ. Для валидации лиофилизированного контрольного штамма CVS ВБ нами сформулированы и предложены стандартные критерии, параметры для оценки ее качества и разработаны тесты контроля штамма CVS ВБ, внесенные в стандарт организации.

РЕЗЮМЕ

Проведена оценка эффективности четырех стабилизирующих сред при изготовлении стандартного образца штамма CVS фиксированного вируса бешенства. Установлено, что среда №3 ВГНКИ является наиболее оптимальной для использования при сублимационном высушивании вирусных суспензий фиксированного вируса бешенства, полученных на культуре клеток и из мозговой ткани зараженных животных. Образцы лиофилизированного штамма CVS с использованием среды №3 ВГНКИ сохраняли высокую активность в тесте «ускоренного старения» и при хранении в режиме от +4° С до -70° С.

SUMMARY

The efficacy of four maintenance media for the production of a reference sample of the rabies fixed virus CVS strain was evaluated. It was stated that the VGNKI No. 3 medium was the optimum medium for freeze-drying of the rabies fixed virus suspensions produced in cell cultures and from brain tissue of infected animals. Freeze-dried CVS strain samples when used with the VGNKI No.3 medium maintained high activity in the «accelerated aging» test and under storage conditions from +4° C to -70° C.

Литература

1. ГОСТ Р ИСО 9001-2001. Система менеджмента качества. Требования. – Введ.2002-08-31. – М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов,2001.- 21с.
2. ГОСТ Р 52249-2004. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. – Введ. 2005-01-01. – М.: Госстандарт России:Изд-во стандартов,2004. - 211 с.
3. ГОСТ Р 52537-2006. Производство лекарственных средств. Система обеспечения качества. Общие требования. – Введ.2006-03-01. – М.: Ростехрегулирование: Изд-во стандартов, 2006. – 51 с.
4. К вопросу о стандартизации разработки технологии сублимационного высушивания биопрепаратов (I сообщение) / А.Я. Самуйленко, А.А. Нежута, В.И. Еремец [и др.] // Актуальн. пробл. инфекционной патологии животных: материалы Междунар. конф., посвящен. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2005. – С. 379-383.
5. К вопросу о стандартизации разработки технологии сублимационного высушивания биопрепаратов (2 сообщение) / А.Я. Самуйленко, А.А. Нежута, В.И. Еремец [и др.] // Актуальн. пробл. инфекц. патологии животных: материалы Междунар. конф., посвящен. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2005. – С. 384-387.
6. Маринеску, И Основы математической статистики и ее применение / И. Маринеску, Ч. Мойнячу, Р. Никулеску // – М.: Статистика, 1970. – 224 с.
7. Платонов, А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, компьютерные методы / А.Е.Платонов. - М.: Изд-во РАМН, 2000. – 52 с.

УДК 619:616.98:578.835.

И.И. Сытник, Ш.Ж. Турсункулов, С.К. Абдрахманов

(ГУ «Национальный центр мониторинга, референции, лабораторной диагностики и методологии в ветеринарии» МСХ РК, г. Астана, Казахстан АО «Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина», г. Астана, Казахстан)

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ И ОРГАНИЗАЦИЯ МЕРОПРИЯТИЙ ПРОТИВ ЯЩУРА В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

Введение

Несомненную важность для здравоохранения и ветеринарной службы Казахстана, а также для национальной безопасности страны представляют особо опасные вирусные заболевания людей, животных, растений и птиц, периодически регистрирующиеся на территории Республики Казахстан. В связи с этим возникает необходимость в эпизоотологическом мониторинге особо опасных инфекции на территории Республики Казахстан.

Увеличивающееся количество вспышек ящура в Европе, Южной Америке, Азии привело к значительному возрастанию затрат на ликвидацию болезни при стратегии борьбы с ящуром на основе стемпинг-аута, связанного с уничтожением всех больных и контактировавших с ними животных [1, 2, 3, 4].

Климатические и географические барьеры являются более серьезным препятствием для распространения болезней животных, чем государственные границы, а такие факторы, как плотность населения, распространение переносчиков возбудителя инфекции, перемещения животных, методы ведения животноводства являются первостепенными для возникновения болезней как в национальном, так и в международном масштабе [4].

В стране, желающей установить сис-